

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 728 585

②1 N° d'enregistrement national :

94 15810

⑤1 Int Cl^e : C 12 N 7/00, 15/86, C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00

CETTE PAGE ANNULE ET REMPLACE LA PRECEDENTE

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.12.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 28.06.96 Bulletin 96/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME*
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : *PERRON HERVE, MALLET
FRANCOIS, MANDRAND BERNARD, BEDIN
FREDERIC et BESEME FREDERIC.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *GERMAIN ET MAUREAU.*

⑤4 **VIRUS MSRV1 ET AGENT PATHOGENE ET/OU INFECTANT MSRV2 ASSOCIES A LA SCLEROSE EN
PLAQUES ET LEURS CONSTITUANTS NUCLEIQUES.**

⑤7 Association de deux agents pathogènes et/ou infec-
tants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un pre-
mier agent qui consiste en un virus humain, possédant une
activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille
d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit vi-
rus, et un second agent, ou un variant dudit second agent,
ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus
d'une même souche virale choisie parmi les souches dé-
nommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992
auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et
MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le
numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches va-
riantes.

pol SHH TGGGAGGCT TGGGAGGCT GCGTGGAGCT TGGGAGGCT AGTGGGAGCT 50
pol SHH TGGGAGGCT AGTGGGAGCT TGGGAGGCT GCGTGGAGCT TGC 93

SEQ ID NO 10

FR 2 728 585 - A1



La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une
5 étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus
connus testés ne s'est avéré être l'agent causal
recherché: une revue des virus recherchés depuis des
années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med.
Virol., 1978; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of
10 clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P.
et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier Science
Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité
d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par
l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP
15 comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943
et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en
Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les
migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes
suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une
20 étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes
assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à
une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir:
Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-
25 853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol.
1979; 36, 490-497). Cependant, cette auto-immunité dirigée
contre certains composants du SNC s'est révélée peu
spécifique de la SEP et fréquente dans les inflammations
du SNC, associées ou non à une infection, ainsi que cela a
30 été montré par Hirayama M. et coll. (Neurology 1986; 36,
276-8), Kenneth G. Warren et coll. (Annals of Neurology
1986; 20, 20-25), Suzumura A. et coll. (Journal of
Neuroimmunology 1986; 11, 137-47), et, Tourtelotte W. et
coll. (Journal of Neurochemistry 1986; 46, 1086-93). De
35 plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field (The Lancet
1989; I, 1272.) aucune des thérapies immuno-

- suppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale : co-sensibilisation à des
- 5 déterminants viraux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire, comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A. (dans "Molecular mimicry: Cross-reactivity between microbes and host proteins as a cause of autoimmunity".
- 10 Oldstone M.B.A., ed. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989) ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1991 54, 853-855), par expression de superantigènes rétroviraux.
- 15 Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un Rétrovirus serait à l'origine de la maladie: la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. Disease 1988; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de
- 20 leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985; 318, 154), M. Ohta et coll. (J. Immunol. 1986; 137, 3440), E. P. Reddy et coll. (Science 1989; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86, 2878), J.H.
- 25 Richardson et coll. (Science 1989; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.
- 30 Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus: le virus MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal: le Maedi, une pneumonie
- 35 interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie

neurologique démyélinisante tardive suivant généralement une phase de latence prolongée, le Visna. La physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. (dans "Handbook of clinical neurology, 12 : Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 1989, 453-466), et A. Haase (Nature 1986; 322, 130-136), elle diffère de l'infection naturelle par ses conséquences neuropathologiques exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïde du cerveau qui constituent un site de latence et de réplication occasionnelle du provirus Visna; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalorachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

De plus, le modèle du Visna apporte une donnée supplémentaire pour l'approche rétrovirologique de ce type de maladie. En effet, il s'avère que, dans le cadre de l'infection naturelle de ces moutons, des coïncidences épidémiologiques et biologiques ont été observées entre d'une part, les pathologies du Maedi-Visna et d'autre part, l'adénomatose ovine pulmonaire ou Jaagsiekte, pathologie tumorale provoquée par un autre rétrovirus, le JSRV (De Martini J.C. et coll., J.N.C.I. 1987; 79, 167-177; Rosadio R.H. et coll., Vet. Pathol. 1988; 25, 58-66;

Dawson M. et coll., Br. Vet. J. 1990; 146, 531-537). Le JSRV est un rétrovirus endogène, voire la souche exogène associée à une famille d'éléments endogènes, dont les propriétés infectieuses et oncogènes ont été mises en évidence (York D. F. et coll., J. Virol, 1992; 66, 4930-4939). Or, il est notable que, dans des isolats naturels de moutons affectés de maladies attribuées soit au rétrovirus Maedi-Visna, soit au rétrovirus Jaagsiekte, on retrouve généralement les deux rétrovirus (Dawson M. et coll., Br. Vet. J., 1990; 146, 531-537; York D.F. et coll., J. Virol., 1991; 65, 5061-5067). Cette coexpression et/ou coinfection semble indiquer un rôle synergique de ces deux rétrovirus dans le cadre du Maedi (De Martini J.C. et coll., J.N.C.I., 1987; 79, 167-177). Ainsi, dans certaines techniques de purification d'isolats naturels sur gradient de saccharose, on a pu mettre en évidence l'existence de deux pics de sédimentation séparés correspondant respectivement au JSRV et au rétrovirus Maedi-Visna (York D.F. et coll., J. Virol., 1991, 65, 5061-5067). Ces données permettent d'entrevoir la complexité d'une approche analytique visant à caractériser un agent rétroviral associé à une maladie donnée, à partir d'isolats naturels dans lesquels peuvent coexister plusieurs agents pathogènes.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol., 1989, 140, 551-561; dans: "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p111-116; The Lancet, 1991, 337, 862-863). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient des anticorps susceptibles de reconnaître des protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes

immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll., Herpes simplex virus ICPO and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis., 1993, J. Gen. Virol., 74, 65-72).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol., 1989, 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type LM7".

Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attaché à caractériser le matériel nucléaire associé aux particules virales produites dans ces cultures.

Ainsi, les objets de l'invention sont les suivants:

- à l'état isolé ou purifié, et en tant que matériel biologique, l'association de deux agents pathogènes et/ou infectants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent qui consiste en un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes,

15 - à l'état isolé ou purifié, et en tant que matériel biologique, l'association de deux agents pathogènes et/ou infectants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent consistant en un virus humain possédant une activité transcriptase inverse, et
20 apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées
25 respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire l'un ou l'autre des agents
30 pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants,

- à l'état isolé ou purifié, et en tant que matériel biologique, l'association de deux agents pathogènes et/ou infectants, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le
35 génome comprend un fragment comprenant une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique

choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou comprenant une séquence équivalente, 5 notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs 10 séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, ou comprenant une 15 séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

20 - le procédé de détection d'un premier agent pathogène et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre au moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment dont la 25 séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment 30 une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences 35 complémentaires, et/ou un second fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie

parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs
séquences complémentaires, ou une séquence équivalente,
notamment une séquence nucléotidique présentant au moins
50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une
5 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010,
SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences
complémentaires, chacun desdits fragments pouvant être une
sonde de détection ou une amorce d'amplification,

- une composition diagnostique, prophylactique ou
10 thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un
premier fragment nucléique dont la séquence nucléotidique
comprend une séquence nucléotidique choisie parmi
SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
15 SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une
séquence équivalente, notamment une séquence
nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au
moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique
choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,
20 SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences
complémentaires, et/ou un second fragment nucléique dont
la séquence nucléotidique comprend une séquence
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011,
25 SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, ou une
séquence équivalente, notamment une séquence
nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au
moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique
choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs
30 séquences complémentaires,

- un procédé pour détecter et/ou identifier une
association d'agents pathologiques et/ou infectants,
associés à la sclérose en plaques, dans un échantillon
biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN
35 et/ou un ADN spécifique à chaque dit agent pathologique
et/ou infectant, et/ou leur ARN et/ou ADN complémentaire,

avec une association d'un fragment nucléotidique et d'un second fragment nucléotidique, la séquence nucléotidique dudit premier fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, 5 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence 10 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et la séquence nucléotidique dudit second fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie 15 parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, 20 SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

- un procédé de détection d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en 25 plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre un premier peptide codé de manière partielle ou totale par le premier fragment nucléotidique de l'invention défini ci-dessus, et/ou un second peptide codé de manière partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique de 30 l'invention défini ci-dessus,

- une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le premier peptide et/ou le second peptide, définis ci-dessus,

35 - une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un

premier ligand spécifique du premier peptide de l'invention, et/ou un second ligand spécifique du second peptide de l'invention,

- en tant que matériel nucléaire, un fragment
5 nucléotidique à l'état isolé ou purifié, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique choisie parmi
SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
SEQ ID N09, SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et
10 leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N01,
SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,
15 SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N010,
SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

- un ARN ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment tel que défini au
20 paragraphe précédent,

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en
25 plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment tel que défini précédemment, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au
30 moins une partie dudit fragment,

- l'amorce précitée, caractérisée en ce qu'elle possède une séquence nucléotidique choisie parmi
SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016,
SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020,
35 SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024,

SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires,

- une sonde de détection susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment tel que défini précédemment, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment,

- la sonde précitée, caractérisée en ce qu'elle possède une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026 et SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N010, et SEQ ID N011, et leurs séquences complémentaires,

- l'utilisation d'une sonde de l'invention, ou d'une amorce de l'invention, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques,

- en tant que matériel biologique, et à l'état purifié ou isolé, un agent pathogène et/ou infectant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique comprenant une séquence

nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires,

- une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique antisens, notamment pour le traitement de la
5 sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment tel que défini précédemment, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 %
10 d'homologie avec au moins une partie dudit fragment,

- un procédé pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, l'agent pathogène et/ou infectant précité, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit agent, et/ou leur ADN
15 et/ou ARN complémentaires, avec au moins un fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et
20 préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires,

- le procédé précité, caractérisé en ce que,
25 avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification comprenant une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013
30 SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence
35 nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une

séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013
 SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017,
 SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021,
 SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et
 5 SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires, et on
 amplifie ledit ARN et/ou ADN,

- un procédé pour quantifier, dans un échantillon
 biologique, l'expression d'un agent pathogène et/ou
 infectant associé à la sclérose en plaques, caractérisé en
 10 ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique
 audit agent et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à au
 moins une sonde comprenant une séquence nucléotidique
 choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015,
 SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019,
 15 SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023,
 SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026 et SEQ ID N03,
 SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,
 SEQ ID N010, et SEQ ID N011 et leurs séquences
 complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment
 20 une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et
 préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une
 séquence nucléotidique consistant en une séquence
 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014,
 SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018,
 25 SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022,
 SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et
 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,
 SEQ ID N07, SEQ ID N010, et SEQ ID N011, et leurs
 séquences complémentaires, et on amplifie ledit ARN et/ou
 30 ADN.

Avant de détailler l'invention, différents termes
 utilisés dans la description et les revendications sont à
 présent définis :

- par souche virale ou isolat, on entend toute
 35 fraction biologique infectante et/ou pathogène, contenant
 par exemple des virus et/ou des bactéries et/ou des

parasites, et caractérisant le pouvoir pathogène et/ou antigénique, hébergée par une culture ou un hôte vivant.

- le terme "MSRV" utilisé dans la présente description désigne tout agent pathogène et/ou infectant, 5 ou associé à la sclérose en plaques, les souches atténuées de ladite espèce virale, ou les particules défectives interférentes dérivées de cette espèce. Il est connu que les virus et particulièrement les virus contenant de l'ARN ont des taux relativement élevés de mutation spontanée 10 (Fields and Knipe (1986) Fundamental Virology (Rev Press N.Y.)), dont il sera tenu compte ci-après pour définir la notion d'équivalence,

- par virus humain, on entend un virus susceptible d'infecter l'être humain,

15 - compte tenu de toutes ces variations, les objets de la présente invention définis ci-dessus ont été exprimés en tenant compte des équivalents ou dérivés, notamment des séquences homologues nucléotidiques ou peptidiques,

20 - le variant d'un virus ou d'un agent pathogène et/ou infectant comprend au moins un antigène reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant dudit virus et/ou dudit agent pathogène et/ou infectant, et/ou dont le génome est détecté par au 25 moins une sonde et/ou au moins une amorce d'amplification nucléotidique spécifique, comme par exemple celles choisies parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, 30 SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026 d'hybridation, et leurs séquences complémentaires, dans des conditions d'hybridation déterminées bien connues de l'homme de l'art,

- selon l'invention, un fragment nucléotidique ou 35 un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence, informationnelle ou non, des

acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à tout autre fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à
5 partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée;
10 dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments
15 constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-
20 désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre, à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), et au niveau du groupement phosphate par exemple son
25 remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique
30 et l'ordre dans un sens de référence constituent une information fonctionnelle de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux
35 fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un brin multiple,

- une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins dix monomères, avantageusement de 10 à 100 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées ; bien entendu dans 5 certaines conditions particulières, il peut être utile d'utiliser des sondes plus longues ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection, ou à des fins de thérapie,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur 10 un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi notamment parmi les isotopes radioactifs, 15 des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases 20 nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular 25 Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT" [SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 30 (1977)) ; avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention, comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence 35 nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider in vivo sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription, et/ou
5 pour dégrader ledit ADN et/ou ARN,

- une amorce est une sonde comprenant au moins dix monomères, et avantageusement de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une
10 polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- deux séquences nucléotidiques ou peptidiques sont dites équivalentes, si fonctionnellement elles jouent le même rôle, vis-à-vis de l'application considérée, ou dans la technique dans laquelle elles interviennent; deux séquences équivalentes ou leurs compléments sont
20 susceptibles de s'hybrider l'une sur l'autre; sont notamment équivalentes deux séquences obtenues par variation naturelle ou non de l'une par rapport à l'autre, ainsi que de séquences homologues, l'homologie étant définie ci-après,

- par variabilité, on entend toute modification, spontanée ou non d'une séquence, notamment par substitution, et/ou insertion, et/ou délétion de nucléotides et/ou des fragments nucléotidiques; une variabilité non naturelle peut résulter des techniques de
30 génie génétique utilisées, par exemple du choix des amorces de synthèse dégénérées ou non, retenues pour amplifier un acide nucléique; cette variabilité peut se traduire par des modifications de toute séquence de départ, considérée comme référence, et pouvant être
35 exprimée par un degré d'homologie par rapport à ladite séquence de référence,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques ou peptidiques comparés; elle est appréciée par le degré d'homologie qui est notamment déterminé par comparaison directe de séquences
5 nucléotidiques ou peptidiques obtenues à des séquences nucléotidiques ou peptidiques de référence,

- par peptide, oligopeptide ou protéine, on entend notamment tout peptide, oligopeptide ou protéine extrait, séparé, ou substantiellement isolé, par
10 l'intervention de la main de l'homme, notamment ceux obtenus par synthèse chimique, ou par expression dans un organisme recombinant,

- par peptide codé de manière partielle par un fragment nucléotidique, on entend un peptide présentant au
15 moins 3 acides aminés codés par au moins 9 monomères contigus compris dans ledit fragment nucléotidique,

- un acide aminé est dit homologue d'un autre acide aminé, lorsque leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que polarité, hydrophobicité, et/ou
20 basicité, et/ou acidité, et/ou neutralité, sont sensiblement les mêmes; ainsi, une leucine est homologue d'une isoleucine.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement
25 caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

Etant donné que l'agent pathogène (MSRV)-2 a été
30 détecté tant en ADN qu'en ARN dans les cellules infectées, le même raisonnement sera tenu a priori en ce qui le concerne.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence
35 aux figures annexées dans lesquelles:

- la figure 1 représente la séquence de type MSRV-2A obtenue à partir des cultures LM7 selon le protocole de Shih et coll.(J. Virol., 1989, 63, 64-75) ; cette séquence est identifiée sous la référence
5 SEQ ID N010,

- la figure 2 représente des consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par la technique PCR dans la région "pol", à partir d'ADN viral issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiés sous les
10 références SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, et le consensus commun avec amorces d'amplification portant la référence SEQ ID N07,

- la figure 3 représente l'arbre phylogénétique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la
15 région "pol" définie par Shih et coll.,

- la figure 4 donne la définition d'une trame de lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-1B/"PCR pol", lesdites familles A à D étant définies respectivement par les sequences nucléotidiques
20 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, décrites à la figure 2,

- la figure 5 donne un exemple de consensus des séquences de MSRV-2B, identifié par SEQ ID N011,

- la figure 6 est une représentation de
25 l'activité transcriptase inverse (RT) en dpm (désintégration par minute), dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP,

30 - la figure 7 donne, dans les mêmes conditions qu'à la figure 6, le dosage de l'activité transcriptase inverse dans la culture d'une lignée de lymphocytes B obtenue à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques,

35 - la figure 8 représente la séquence nucléotidique du clone PSJ17 (SEQ ID N09)

- la figure 9 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N08, du clone dénommé M003-P004,
- la figure 10 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N02 du clone F11-1; la partie repérée
5 entre deux flèches dans la région de l'amorce correspond à une variabilité imposée par le choix de l'amorce ayant servi au clonage de F11-1; sur cette même figure, la traduction en acides aminés est représentée,
- la figure 11 représente la séquence
10 nucléotidique SEQ ID N01, et une trame fonctionnelle de lecture possible en acides aminés de SEQ ID N01; sur cette séquence, les séquences consensus des transcriptases inverses rétrovirales sont soulignées,
- la figure 12 représente la séquence
15 nucléotidique SEQ ID N012 du clone dénommé MSRV2EL1,
- la figure 13 décomposée en trois planches successives 13/18 à 15/18 représente la traduction en acides aminés de SEQ ID N012, incluant l'amorce SEQ ID N013, selon 6 trames de lecture possibles,
- 20 - la figure 14 présente un alignement de la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV2-EL1 (SEQ ID N012); sur cette même représentation, la région d'hybridation de l'amorce identifiée sous la référence SEQ ID N013, (hormis la queue de clonage) est encadrée;
25 celle de l'amorce identifiée sous la référence SEQ ID N014, est signalée entre des crochets,
- la figure 15 donne les résultats d'une PCR, sous forme de photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure d'éthidium, des
30 produits d'amplification obtenus à partir des amorces identifiées par SEQ ID N014 et SEQ ID N015,
- les figures 16 et 17 donnent les résultats d'une PCR, sous forme de photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure
35 d'éthidium, des produits d'amplification obtenus à partir

des amorces identifiées par SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, et SEQ ID N019.

EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES MSRV-2 PAR
5 **AMPLIFICATION DES REGIONS CONSERVEES DES GENES D'ADN-**
POLYMERASES ARN-DEPENDANTES SUR UNE PREPARATION D'AGENT
INFECTANT PURIFIE A PARTIR DE CULTURE DE CELLULES DE LA
LIGNEE LM7

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une
10 technique PCR publiée par Shih et coll. (Detection of
multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in
human nucleic acids : relation to primate retroviruses. J.
Virol. 1989 ; 63, 64-75) qui permet d'amplifier une région
relativement conservée du gène pol des rétrovirus exogènes
15 et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme
à activité transcriptase inverse (RT) tels que notamment
le virus de l'hépatite B et, implicitement, de tout gène
d'ADN polymérase ARN dépendante ou d'enzyme présentant des
homologies de séquences suffisantes dans les régions
20 définies par les amorces d'amplification utilisées. Cette
technique PCR a été utilisée sur les acides nucléiques
extraits d'une préparation d'agent infectant purifiée,
obtenue selon le protocole décrit par Perron et coll.
(Research in Virology 1992, 143, 337-350), à partir des
25 surnageants de la culture LM7 d'origine (Perron et coll.,
Res. Virol. 1989 , 140, 551-561) gardés congelés à -80°C
depuis lors. Les fractions contenant le pic d'activité RT
de type LM7 sont reprises dans un volume d'un tampon
contenant du thiocyanate de guanidine (P.Chomzynski et N.
30 Sacchi, Analytical Biochemistry, 1987, 162, 156-159) et
sont stockées à -80°C jusqu'à extraction des acides
nucléiques selon la technique décrite par P.Chomzynski et
N. Sacchi (Analytical Biochemistry 1987;162,156-159).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de
35 l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc)
avec des amorces dites "random" (hexanucléotides en

mélange) à l'aide du Kit "cDNA synthesis system plus" (Amersham), selon les instructions du fabricant et en se basant sur une valeur approximée à un log près de la quantité d'ARN présente dans l'échantillon.

5 L'ADN obtenu après amplification PCR de l'ADNc, a été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning® (British Biotechnology). Les 2µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée sterile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION
10 BUFFER", 2µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning®. A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes ont été
15 repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La préparation de plasmide de
20 chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après
25 hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du "TA cloning kit". La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye
30 deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Les séquences obtenues ont ensuite été analysées
35 à l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque de données informatiques Genbank®, pour les

séquences nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences en acides aminés déduites des trames de lecture mises en évidence dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences obtenues à partir de l'échantillon viral
5 provenant des surnageants LM7 décongelés, et purifié au pic d'activité transcriptase inverse sur gradient de saccharose, a mis en évidence une population majoritaire de clones (environ 42% des clones), relativement à la représentativité individuelle des autres séquences
10 (toujours inférieure à 5%, voire 10% pour un petit nombre), et présentant des homologies partielles avec des rétrovirus connus dans la région "pol" attendue. Ce clone est dénommé MSRV2-A et identifié par SEQ ID N010 (Cf. Fig. 1). La région amplifiée entre les amorces PCR
15 est homologue à la séquence correspondante MSRV2-B identifiée par SEQ ID N011 (Cf. Fig. 5), décrite dans l'exemple 2. Les différences observées dans les séquences situées au niveau des amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange, utilisées
20 dans des conditions techniques différentes. L'interrogation de la banque de données Genbank® actualisée à ce jour n'a pas permis de mettre en évidence une séquence identique ou présentant des homologies significatives.

25 Cette séquence est présentée dans la figure 1. Elle présente un cadre de lecture ouvert en phase avec les deux amorces PCR retrouvées aux extrémités, mais elle est plus courte que l'ensemble des séquences rétrovirales connues dans la région attendue entre ces amorces. Une
30 délétion de 45 paires de bases (15 acides aminés) y est observée à la suite de la séquence de l'amorce amont alors que les séquences précédant l'amorce aval sont présentes. Cependant la trame de lecture est ouverte et ininterrompue sur toute la séquence incluant les amorces et la séquence
35 en acides aminés déduite présente une homologie significative avec la région correspondante des rétrovirus

connus. Dans la séquence interne aux amorces PCR, les acides aminés E, R, Q, P et D, normalement assez bien conservés dans cette région pol des rétrovirus et des virus avec activité transcriptase inverse connus (Shih et coll., J. Virol., 1989, 63, 64-75) sont retrouvés conservés aux bonnes positions dans la trame de lecture de la séquence originale.

Enfin, étant donné que cette séquence est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données, on peut avancer qu'il s'agit d'une séquence appartenant à un nouvel agent infectant et/ou pathogène, dénommé MSRV-2A. Cet agent s'apparente à priori, d'après l'analyse des séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il peut aussi s'agir d'un virus à ARN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (Shih et coll., J. Virol., 1989, 63, 64-75). De plus, le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent pathogène et/ou co-infectant prokaryote ou eukaryote (protiste).

EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UN RETROVIRUS MSRV-1 ET UN AGENT CO-INFECTANT MSRV2 PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS, SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7PC ET PLI-2

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll. (J. Virol., 1989, 63, 64-75) a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par l'ADNase,

d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc synthétisé à partir d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de l'ADNase sur l'ARN. En effet, l'ADNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll., a été utilisée sur un ADNc synthétisé à partir des acides nucléiques de fractions de particules infectantes purifiées sur gradient de saccharose selon la technique décrite par Perron et coll. (Research in Virology, 1992, 143, 337-350) à partir de l'isolat "POL-2" (ECACC n°V92072202) produit par la lignée PLI-2 (ECACC n°92072201) d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG (ECACC n°V93010816) produit par la lignée LM7PC (ECACC n°93010817) d'autre part. Ces cultures ont été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet des demandes de brevet publiées sous les n° WO 93/20188 et WO 93/20189.

Après clonage avec le TA Cloning Kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide du séquenceur automatique selon ce qui est décrit dans l'exemple 1, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version disponible de la banque de données Genbank®.

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces échantillons correspondent notamment à deux types de séquences: un premier type de séquence, retrouvé dans la majorité des clones (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) qui correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus

endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9, et un second type de séquence qui correspond à des séquences très fortement homologues à la séquence attribuée à un agent infectant et/ou pathogène dénommé précédemment MSRV-2.

5 Le premier type de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des
10 quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 par exemple (Meyerhans et al., Cell 1989, 58, 901-910), ou comme le résultat de l'interférence avec plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices. Ces
15 éléments endogènes plus ou moins défectifs sont sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par un provirus répliatif, puisqu'ils appartiennent à la même famille de rétrovirus endogènes (Linial M.L. and Miller A.D., dans "Current topics in microbiology and
20 immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K., éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce rétrovirale dont on a obtenu en culture la
25 génération de quasi-espèces, et qui contient un consensus des séquences décrites ci-dessous est dénommée MSRV-1B.

Dans la figure 2 sont présentées les séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience, ces séquences étant respectivement identifiées
30 par SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données Genbank®. L'arbre phylogénétique de ces séquences est présenté dans
35 la figure 3. Dans cette figure, les sous-familles A, B, C, D représentent les séquences qui ont été retrouvées de

manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons d'ARN pur de virions purifiés à partir des isolats MS7PG et POL-2. A partir de ces familles de séquences, quatre séquences
5 nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène, ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 4, avec la
10 traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B, et l'on peut voir que la trame de lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence en acides aminés venant en deuxième ligne sous
15 la séquence en acide nucléiques. Le consensus général de la séquence MSRV-1B, identifié par SEQ ID N07 et obtenu par cette technique PCR dans la région "pol" est présenté dans la figure 2.

Le deuxième type de séquence représentant la
20 majorité des clones séquencés est représenté par la séquence MSRV-2B présentée dans la figure 5 et identifiée par SEQ ID N011. La région amplifiée entre les amorces PCR est homologue à une base près à la séquence MSRV2-A (SEQ ID n° 10 selon Fig.1) interne aux amorces PCR décrite
25 dans l'exemple 1. Les différences observées dans les séquences correspondant aux amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange utilisées dans des conditions techniques différentes.

Les séquences MSRV-2A (SEQ ID N010) et MSRV-2B
30 (SEQ ID N011) sont à l'évidence homologues, voire identiques, issues du même organisme et suffisamment divergentes des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données pour qu'on puisse avancer qu'il s'agit d'une région de séquence appartenant à un nouvel
35 agent infectant, dénommé MSRV-2. Cet agent infectant s'apparenterait à priori, d'après l'analyse des premières

séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ARN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (Shih et coll., J. Virol., 1989, 63, 64-75). De plus, le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent pathogène et/ou co-infectant prokaryote ou eukaryote (protiste).

EXEMPLE 3: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1 et MSRV2, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS, SUR DES PREPARATIONS DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP

La même technique PCR modifiée d'après la technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier et séquencer le matériel nucléaire ARN présent dans une fraction de virions purifiée au pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7", sur gradient de saccharose selon la technique décrite par Perron et coll., (Research in Virology 1992, 143, 337-350), et selon les protocoles mentionnés dans l'exemple 2, à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV), après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine dans un milieu de culture approprié contenant une concentration appropriée de cyclosporine A. Une représentation de l'activité transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par cette lignée est présentée dans la

figure 6. De même, les surnageants de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques ont été traités dans les mêmes conditions, et le dosage de l'activité transcriptase inverse dans les fractions du gradient de saccharose s'est avéré négatif partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 7. La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de SEP et la même fraction sans activité transcriptase inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih et coll., suivie des mêmes étapes de clonage et de séquençage tels que décrites dans les exemples 1 et 2.

Il est tout à fait notable que les séquences de type MSRV-1 et MSRV-2 soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de type Mo-MuLV provenant de la transcriptase inverse commerciale utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADNc et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin, du fait de l'amplification "consensus" des séquences de polymérases homologues que réalise cette technique PCR. De plus, l'absence de cible concentrée qui fait compétition pour la réaction d'amplification dans l'échantillon témoin permet l'amplification de contaminants dilués. La différence de résultats est à l'évidence hautement significative (χ^2 , $p < 0,001$).

EXEMPLE 4: OBTENTION D'UN CLONE PSJ17, DEFINISSANT UN RETROVIRUS MSRV-1, PAR REACTION DE TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.

Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans l'isolat, en utilisant l'activité transcriptase inverse présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les particules rétrovirales (Lori F. et coll., J. Virol., 1992, 66, 5067-5074). Ainsi l'obtention de séquences rétrovirales spécifiques dans un matériel contaminé par des acides nucléiques cellulaires, a été optimisée selon ces auteurs grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus dans des virions pouvait être effective in vitro; Ces conditions correspondent à la description technique des protocoles présentés ci-dessous (réaction de RT endogène, purification, clonage et séquençage).

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparés selon la méthode suivante : les surnageants de culture sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45. T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virion concentré, mais non purifié. Cet échantillon viral concentré mais non purifié a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse

endogène, telle que décrite ci-après : un volume de 200 μ l de virion purifié selon le protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5 millions de dpm est décongelé à 37°C jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon 5 fois concentré a été préparé avec les composants suivants: Tris-HCl pH 8.2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl₂ 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0,10 %. 100 μ l de tampon 5X + 25 μ l d'une solution de dATP 100mM + 25 μ l d'une solution de dTTP 100mM + 25 μ l d'une solution de dGTP 100mM + 25 μ l d'une solution de dCTP 100mM + 100 μ l d'eau distillée stérile + 200 μ l de la suspension de virions (activité T.I. de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C pendant 3 heures. Après cette incubation le mélange réactionnel est directement ajouté à un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803); la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour ré-extraire le matériel nucléaire résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes d'éthanol + 1 μ l de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) et mise à -20°C de l'échantillon pendant 4h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70% et resuspendu dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon les protocoles décrits ci-après: des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémités ont été générés: une réaction de "remplissage" a d'abord été effectuée: 25 μ l de la solution d'ADN précédemment purifiée ont été mélangés avec 2 μ l d'une solution 2.5 mM contenant, en quantité équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 μ l d'ADN polymérase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 μ l de 10X "incubation buffer for restriction enzyme"

(Boehringer-Mannheim ref. 1417 975) / 1 μ l d'une solution à 1% de sérum-albumine bovine / 16 μ l d'eau distillée stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 μ l de tampon TE et 1 μ l de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction des acides nucléiques avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN précipité après centrifugation est resuspendu dans 10 μ l de tampon 10 mM Tris pH 7.5. Puis, 5 μ l de cette suspension ont été mélangés avec 20 μ l de tampon Taq 5X, 20 μ l de 5mM dATP, 1 μ l (5U) de Taq ADN polymérase (AmplitaqTM) et 54 μ l d'eau distillée stérile. Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la solution aqueuse prélevée en dessous du film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2 μ l d'eau distillée stérile. L'ADN obtenu a été inséré dans un plamide à l'aide du kit TA CloningTM. Les 2 μ l de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 μ l d'eau distillée stérile, 1 μ l d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 μ l de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 μ l de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning[®] (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le

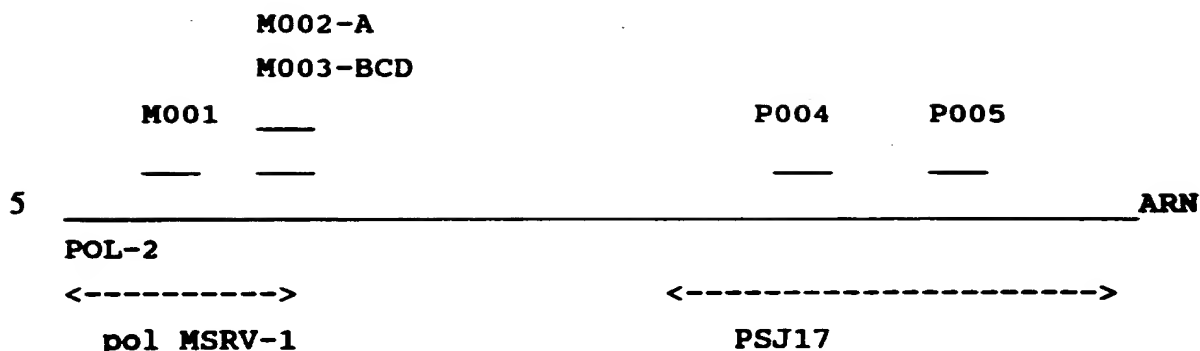
séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA cloning kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer, modèle 373 A Applied Biosystems, selon les instructions du fabricant.

L'analyse discriminante sur les banques de données informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence une séquence de type rétroviral. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 8 et identifiée apr SEQ ID N09, a été analysée à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genebank®". L'analyse des banques de données n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec certains éléments rétroviraux connus. L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (La Mantia et coll., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1513-1520).

EXEMPLE 5: Amplification PCR de la séquence nucléique contenue entre la région 5' définie par le clone "pol MSRV-1B" et la région 3' définie par le clone PSJ17.

Cinq oligonucléotides, M001, M002-A, M003-BCD, P004 et P005, ont été définis pour amplifier de l'ARN provenant de virions purifiés POL-2. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). L'amplification consiste en une étape de RT-PCR selon le

protocole décrit dans l'Exemple 2, suivie d'une PCR "nichée" selon le protocole PCR décrit dans la demande de brevet EP-A-0569272. Dans le premier cycle RT-PCR, les amorces M001 et P004 ou P005 sont utilisées. Dans le
5 deuxième cycle PCR, les amorces M002-A ou M003-BCD, et l'amorce P004 sont utilisés. Les amorces sont positionnées comme suit:



10 Leur composition est:

amorce M001: GGTCITICCAIGG (SEQ ID N020)

amorce M002-A: TTAGGGATAGCCCTCATCTCT (SEQ ID N021)

amorce M003-BCD: TCAGGGATAGCCCCCATCTAT (SEQ ID N022)

amorce P004: AACCCCTTTGCCACTACATCAATTT (SEQ ID N023)

15 amorce P005: GCGTAAGGACTCCTAGAGCTATT (SEQ ID N024)

Le produit d'amplification "nichée" obtenu et dénommé M003-P004 est présenté dans la figure 9, et correspond à la séquence SEQ ID N08.

20 **EXEMPLE 6: AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION**
DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA
IDENTIFIEE, DANS UN ECHANTILLON DE VIRUS PURIFIE AU PIC
D'ACTIVITE TRANSCRIPTASE INVERSE

Une technique PCR dérivée de la technique publiée
25 par Frohman et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988,
85, 8998-9002) a été utilisée. La technique dérivée
permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à
amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du
génome à analyser. Cette variante technique est décrite
30 dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories
Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie avec son produit
"5'-AmplifINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une
fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le
35 protocole du kit pour la synthèse du cDNA et

l'amplification PCR sont respectivement complémentaires aux séquences MSRV-1 suivantes:

5 cDNA : TCATCCATGTACCGAAGG (SEQ ID N025)
amplification : ATGGGGTTCCCAAGTTCCT (SEQ ID N026)

Les produits issus de la PCR ont été purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), puis resuspendus dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement
10 inséré dans un plamide à l'aide du kit TA CloningTM (British Biotechnology). Les 2µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2µl de "PCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1µl de "TA
15 DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être
25 cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie
30 recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce
35 complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit®. La réaction préalable au

séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virion purifié comme décrit ci-après, sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 trs/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol., 1989, 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT "de type LM7" sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 trs/min (100 000 g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virion purifié ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction

de synthèse de cDNA mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN extrait de virion extracellulaire purifié. L'amplification PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone F1-11 dont la séquence
5 identifiée par SEQ ID N02, est présentée dans la figure 10.

Ce clone permet de définir, avec les différents clones préalablement séquencés, une région représentative du gène "pol" du rétrovirus MSRV-1, telle que présentée
10 dans la figure 11. Cette séquence dénommée SEQ ID N01 est reconstituée à partir de différents clones se recouvrant à leurs extrémités, en corrigeant les artéfacts liés aux amorces et aux techniques d'amplification ou de clonage, qui interrompraient artificiellement la trame de lecture
15 de l'ensemble.

Dans la figure 11, la trame de lecture potentielle avec sa traduction en acides aminés est présentée en dessous de la séquence en acides nucléiques.

20 **EXEMPLE 7: CAPTURE, AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION DU GENOME MSRV-2 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA IDENTIFIEE, DANS UNE CULTURE INFECTEE PAR MSRV-2**

Les surnageants d'une culture cellulaire
25 exprimant une activité transcriptase inverse "de type LM7" similaire à celle décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol., 1989, 140, 551-561) ont été collectés régulièrement pendant plusieurs semaines et conservés congelés à -80°C après addition de 10% de glycérol.
30 L'ensemble des surnageants a ensuite été décongelé afin de concentrer les particules infectantes par ultracentrifugation et de les purifier par centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose; l'activité transcriptase inverse a ensuite été mesurée dans les
35 différentes fractions collectées sur le gradient selon la

méthodologie décrite par H. Perron et coll., (Research in Virology, 1992, 143, 337-350).

Les différentes fractions représentant le pic d'activité transcriptase inverse ont été regroupées afin d'en extraire les acides nucléiques selon un protocole destiné à la purification d'ARN décrit par P. Chomzynski et N. Sacchi (Analytical Biochemistry, 1987, 162, 156-159), mais les acides nucléiques extraits n'ont pas été traités par l'ADNase. Une amplification PCR dérivée de la technique décrite par Shih et coll. (J. Virol., 1989, 63, 64-75) a été effectuée directement sur cet échantillon d'acides nucléiques non traité par l'ADNase, selon un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans la demande de brevet EP-A-0 569 272, dans un volume total de 100 μ l, contenant 200ng d'ARN, 1 μ l d'ARN Guard, 33 μ moles de chaque mélange d'amorces (MOP) décrits par Shih et coll., et identiques à ceux utilisés pour la PCR (ADN) directe ; 0,25mM de chaque dNTP, 10 μ l de tampon 10X, 2,5 u d'enzyme Taq et 0,4 μ l d'enzyme RT (RT-AMV; 10u) sont aussi ajoutés aux échantillons. Les cycles d'amplification sont réalisés comme suit: dénaturation de l'ARN 65°C/10 minutes, synthèse de l'ADNc 50°C/8 minutes puis les cycles sont identiques à ceux de la PCR décrite par Shih et collaborateurs. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler l'absence de contaminants (réaction sur de l'eau). Les produits ont été analysés sur gel d'acrylamide 10%.

Les échantillons amplifiés par RT-PCR ont ensuite été clonés et séquencés selon les techniques décrites dans l'exemple 1.

La majorité des clones séquencés à partir du produit de RT-PCR correspond à la séquence MSRV-2A et à son équivalente MSRV-2B précédemment décrites dans les exemples 1 à 3.

Par ailleurs, après élimination des séquences artéfactuelles, il s'avère que les autres clones séquencés

correspondent à des séquences de type MSRV-1 telles que décrites dans les exemples 1 à 3.

Après la vérification des séquences présentes dans ce matériel nucléaire provenant de ces fractions
5 purifiées contenant des particules infectantes dont au moins une partie est associée à une activité transcriptase inverse, le matériel nucléaire restant a été utilisé pour effectuer une capture spécifique des acides nucléiques portant la séquence MSRV2 préalablement identifiée et
10 décrite dans les exemples 1 à 3.

Dans une étape préalable, le matériel génétique portant la séquence MSRV2 a été amplifié par une technique PCR monodirectionnelle de 50 cycles à l'aide d'une seule
15 à son extrémité 3', permet l'amplification monodirectionnelle de 3' vers 5' et correspond à la séquence suivante SEQ ID NO 30 :

5' TAAAGATCTAGAATTCGGCTATAGGCGGCATCCGGCAACT 3'

20

Ensuite, la capture a été effectuée en solution avec des billes magnétiques couplées à l'avidine (Dynabeads®) selon les instructions du fabricant (Dyna) et, après une série de lavages à température ambiante
25 permettant d'éliminer les acides nucléiques non couplés à une biotine, une PCR a été effectuée directement sur ces billes lavées avec une amorce spécifique en 3' et une amorce en 5' apportée par une solution d'oligonucléotide de 10 bases (10 mer) avec une séquence aléatoire.

30 L'amorce d'amplification spécifique orientée de 3' vers 5' correspond à la séquence identifiée par SEQ ID N013:

5' GCATCCGGCAACTGCACG 3'

35

La PCR effectuée à 35°C sur 40 cycles avec ces amorces a permis d'amplifier le matériel génétique spécifiquement biotinilé par la première étape de PCR et capturé sur les billes Dynabeads®. Après clonage avec le
5 kit "TA cloning" de l'ADN amplifié par cette seconde étape de PCR et séquençage des clones recombinants, selon les techniques décrites dans l'exemple 1, une séquence de 748 paires de bases a été obtenue. Cette séquence d'acides nucléiques SEQ ID N012 est présentée dans la figure 12.
10 Cette séquence élonguée sera dénommée ensuite MSRV-2EL1.

La séquence inverse complémentaire de l'amorce SEQ ID N013 est présente à l'extrémité 3' et est encadrée sur la figure 12. En amont de cette amorce, on retrouve la séquence déjà identifiée dans les clones MSRV-2A et MSRV-
15 2B.

La traduction en acide aminés de cette séquence selon les 6 trames de lectures possibles est présentée dans la figure 13.

Un alignement de la séquence MSRV2-A
20 (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) est présenté dans la figure 14. On note que la séquence MSRV-2A est rigoureusement identique à la séquence élonguée, hormis quelques différences dans la région correspondant aux amorces dégénérées utilisées pour obtenir MSRV-2A.
25 Cette région est soulignée dans cette figure ; par ailleurs, la région d'hybridation de l'amorce SEQ ID N013, (hormis la queue de clonage) est encadrée, celle de l'amorce SEQ ID N014 est présentée entre crochets. La séquence réelle du génome MSRV-2 dans cette région est
30 vraisemblablement celle de MSRV-2EL1, où elle n'a pas été imposée par des amorces hybridées à basse stringence comme c'est le cas pour MSRV-2A (et MSRV-2B de même).

La séquence MSRV-2EL1 correspond donc à une nouvelle région séquencée du génome MSRV-2. Ceci a été
35 vérifié à l'aide de nouvelles amorces PCR définies dans MSRV-2EL1 et MSRV-2A qui ont permis une amplification

spécifique sur les acides nucléiques utilisés pour le clonage décrit dans cet exemple.

Les exemples suivants présentent différents résultats d'amplifications spécifiques MSRV2 qui confirment la relation avec la présence d'agent infectant correspondant dans les cultures cellulaires décrites, pour permettre l'isolement d'un virus de type LM7 (H. Perron et coll. Res. Virol. 1989; 140, 551-561) et, aussi, in vivo, chez les patients atteints de SEP.

Le résultat d'interrogation de la banque de donnée Genbank®, actualisée en août 1994, avec la séquence MSRV-2EL1 ne montre aucune homologie significative avec des séquences génétiques connues à ce jour. Cependant, l'interrogation des traductions possibles en acides aminés selon les 6 trames de lecture potentielles de cette séquence MSRV-2EL1, montre des homologies partielles avec des séquences bactériennes, virales ou cellulaires.

L'absence d'amplification PCR avec des amorces spécifiques sur de l'ADN humain normal montre qu'il ne s'agit pas d'une séquence d'origine cellulaire. MSRV-2 est donc un agent infectant exogène à l'homme. Cependant, la nature dégénérée des mélanges d'amorces, utilisées selon des variantes de la technique décrite par Shih et coll., qui ont permis l'identification des premiers éléments de séquence dénommés MSRV-2A et MSRV-2B, peut avoir permis l'amplification imprévue d'un génome n'appartenant pas à un rétrovirus, ni même à un gène codant pour une ADN-polymérase ARN-dépendante. La co-détection quasi-systématique de MSRV-1 dans les cultures provenant de SEP et exprimant une activité transcriptase inverse peut s'expliquer par une association pathologique entre deux agents différents dont l'un au moins est un rétrovirus (MSRV-1).

La détection chez les malades de ces deux types de séquences décrite dans les exemples suivants corrobore

une association pathologique. Cependant un seul de ces éléments peut suffire à expliquer la pathologie induite dans la SEP.

5 **EXEMPLE 8: DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES MSRV-2 DANS DIFFERENTS ECHANTILLONS DE CELLULES HUMAINES PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP OU DE TEMOINS**

10 La séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) a permis de définir plusieurs couples d'amorces oligonucléotidiques utilisables pour l'amplification d'ADN ou d'ARN spécifiques par la technique PCR.

15 Les amorces définies ci-après ont permis de réaliser une détection spécifique du génome MSRV-2 dans différentes cellules humaines, par une étape de RT-PCR selon un un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans la demande de brevet n° EP-A-0 569 272.

Les amorces utilisées sont les suivantes:

20 amorce 5', identifiée par SEQ ID N014
5'GTAGTTCGATGTAGAAAGCG 3'
amorce 3', identifiée par SEQ ID N015
5'GCATCCGGCAACTGCACG 3'

25 La PCR est effectuée selon une succession de 35 cycles enchainant, après l'étape de synthèse de l'ADNc, 1 min, à 94°C, 1 min, à 54°C et 1 min, à 72°C.

30 L'ARN total extrait de différents types de cellules selon la technique décrite par P.Chomzynski et N. Sacchi (Analytical Biochemistry 1987;162,156-159) sans traitement par l'ADNase, a été utilisé dans cette réaction RT-PCR.

35 Dans la figure 15, sont présentés les résultats de PCR à partir d'une photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure d'éthidium, dans lequel on a effectué une électrophorèse

des produits d'amplification PCR déposés séparément dans les différents puits.

Le puits numéro 1 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN et les puits 2 à 9 5 représentent, dans l'ordre les produits amplifiés à partir des ARN totaux des cellules suivantes:

2-LM7PC (ECACC n°93010817); 3-PLI2 (ECACC n°92072201); 4-cellules de médulloblastome humain; 5-MRC-5 (Fibroblastes humains de poumons embryonnaires); 6- 10 cellules mononuclées sanguines humaines de donneur sain; 7- cellules provenant d'un mélange de lignées lymphoblastoïdes B dérivées du sang périphérique de différents patients atteints de SEP; 8- cellules provenant d'une lignée lymphoblastoïde B dérivée du sang 15 périphérique d'un patient atteint de SEP; 9- témoin ne contenant pas d'acides nucléiques (témoin "eau").

On peut constater l'existence d'une bande d'ADN spécifique d'environ 700 paires de bases, correspondant à la taille attendue, amplifiée dans les échantillons 20 provenant de patients atteints de SEP (LM7PC, PLI2, lignées de lymphocytes B) et non dans les cellules testées provenant des témoins non-atteints de SEP (MRC5, cellules mononuclées sanguines et médulloblastome).

25 **EXEMPLE 9: DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES MSRV-1 et MSRV-2 DANS DIFFERENTS ECHANTILLONS DE PLASMA PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP OU DE TEMOINS**

La même technique RT-PCR que celle décrite dans 30 l'exemple 8 a été utilisée pour détecter les génomes MSRV-1 et MSRV-2 dans des plasmas obtenus après prélèvement de sang sur EDTA de patients atteints de SEP et de témoins non-SEP.

L'extraction des ARN de plasma a été effectuée 35 selon la technique décrite par P.Chomzynski et N. Sacchi (Analytical Biochemistry, 1987, 162, 156-159), après

addition d'un volume du tampon contenant du guanidinium thiocyanate à 5 ml de plasma gardé congelé à -80°C après recueil.

Pour MSRV-2, la PCR a été effectuée dans les
5 mêmes conditions et avec les mêmes amorces que celles décrites dans l'exemple 8.

Pour MSRV-1, l'amplification a été effectuée en deux étapes. De plus, l'échantillon d'acides nucléiques est préalablement traité par l'ADNase et un contrôle PCR
10 sans RT (transcriptase inverse AMV) est effectué sur les deux étapes d'amplification de manière à vérifier que l'amplification RT-PCR provient exclusivement de l'ARN MSRV-1. En cas de contrôle sans RT positif, l'échantillon aliquoté d'ARN de départ est à nouveau traité par l'ADNase
15 et amplifié à nouveau.

La première étape de RT-PCR MSRV-1 est effectuée selon une variante du procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans la demande de brevet n° EP-A-0 569 272. Notamment, l'étape de synthèse d'ADNc est effectuée à 42°C
20 pendant une heure et l'amplification se déroule sur 40 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette première étape sont les suivantes:

25

amorce 5', identifiée par SEQ ID N016

5'AGGAGTAAGGAAACCCAACGGAC 3'

amorce 3'

5'TAAGAGTTGCACAAGTGCG 3', identifiée par SEQ ID N017

30

Après cette étape, 10µl du produit d'amplification est prélevé et utilisé pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Cette
35 deuxième étape se déroule sur 35 cycles, avec une

température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape sont les suivantes:

5

amorce 5', identifiée par SEQ ID N018

5'TCAGGGATAGCCCCCATCTAT 3'

amorce 3', identifiée par SEQ ID N019

5'AACCCTTTGCCACTACATCAATTT 3'.

10

Dans les figures 17 et 18, sont présentés les résultats de PCR à partir de photographies sous lumière ultra-violette de gels d'agarose imprégnés de bromure d'éthidium, dans lesquels on a effectué une électrophorèse des produits d'amplification PCR déposés séparément dans les différents puits.

La figure 16 représente le résultat de l'amplification spécifique MSRV-2:

le puits numéro 8 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN et les puits 1 à 7 représentent, dans l'ordre, les produits amplifiés à partir des ARN totaux de plasmas provenant de 4 témoins sains exempts de SEP (puits 1 à 4) et de 3 patients atteints de SEP, à différents stades de la maladie (puits 5 à 7).

Dans cette série, du matériel nucléaire MSRV-2 est détecté dans le plasma d'un cas de SEP (puits n° 6) sur les 3 testés : Cf bande à environ 700 pb, 693 pb exactement ; et dans aucun des 4 plasmas témoins ne contient de matériel nucléaire. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

La figure 17 représente le résultat de l'amplification spécifique par RT-PCR "nichée" MSRV-1:

Le puits N°1 contient le produit PCR effectué avec de l'eau seule, sans addition de transcriptase inverse AMV; le puits N°2 contient le produit PCR effectué

avec de l'eau seule, avec addition de transcriptase inverse AMV; le puits numéro 3 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaires ADN; les puits 4 à 13 contiennent, dans l'ordre, les produits amplifiés à partir
5 des ARN totaux extraits de fractions de gradient de saccharose (collectées du haut vers le bas) sur lequel un culot de virion provenant d'un surnageant de culture infectée par MSRV-1 et MSRV-2 a été centrifugé à l'équilibre selon le protocole décrit par Perron et coll.
10 (Research in Virology 1992, 143, 337-350); dans le puits 14 rien n'a été déposé; dans les puits 15 à 17 on a déposé les produits amplifiés d'ARN extrait de plasmas provenant de 3 patients différents atteints de SEP, à différents stades de la maladie.

15 Le génome rétroviral MSRV-1 est bien retrouvé dans la fraction du gradient de saccharose contenant le pic d'activité transcriptase inverse mesurée selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561), avec une très forte intensité
20 (fraction 5 du gradient, déposée dans le puits N°8). Une légère amplification a eu lieu dans la première fraction (puits N°4) correspondant vraisemblablement à de l'ARN libéré par des particules lysées qui flottait à la surface du gradient; de même, des débris agrégés ont sédimenté
25 dans la dernière fraction (fond de tube), cf puits n° 13, entraînant quelques copies de génome MSRV-1 qui ont donné lieu à une amplification de faible intensité.

Sur les 3 plasmas de SEP testés dans cette série, l'ARN MSRV-1 a été retrouvé dans un cas, produisant une
30 amplification très intense (puits N°17).

Dans cette série, le génome ARN rétroviral MSRV-1 correspondant vraisemblablement à des particules de virus extracellulaire présentes dans le plasma en nombre extrêmement faible, a été détecté par RT-PCR "nichée" dans
35 un cas de SEP sur les 3 testés. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

Il est vraisemblable que du virus libre peut circuler dans le flux sanguin de patients en phase de poussée aiguë, en dehors du système nerveux. Ceci est compatible avec l'existence quasi-systématique de
5 "brèches" dans la barrière hémato-encéphalique des patients en phase de SEP.

Il est ainsi possible, outre de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1 et/ou MSRV-2, d'évaluer une thérapie dans la SEP sur la
10 base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients.

REVENDEICATIONS

- 1/ Association de deux agents pathogènes et/ou infectants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent qui consiste en un virus humain, possédant
5 une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les
10 souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes.
- 15 2/ Association de deux agents pathogènes et/ou infectants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent consistant en un virus humain possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit
20 virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès
25 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants.
- 30 3/ Association de deux agents pathogènes et/ou infectants, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le génome comprend une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02,
35 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences

complémentaires, ou comprenant une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, 5 SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique 10 choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, ou comprenant une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie 15 parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

4/ Procédé de détection d'un premier agent pathogène et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la sclérose en 20 plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre au moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, 25 SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, 30 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et/ou un second fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs 35 séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins

50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une
séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010,
SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences
complémentaires, chacun desdits fragments étant notamment
5 une sonde ou une amorce d'amplification.

5/ Composition diagnostique, prophylactique ou
thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un
premier fragment nucléique dont la séquence nucléotidique
comprend une séquence nucléotidique choisie parmi
10 SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une
séquence équivalente, notamment une séquence
nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au
15 moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique
choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,
SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences
complémentaires, et/ou un second fragment nucléique dont
20 la séquence nucléotidique comprend une séquence
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011,
SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, ou une
séquence équivalente, notamment une séquence
nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au
25 moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique
choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs
séquences complémentaires.

6/ Procédé pour détecter et/ou identifier une
association d'agents pathologiques et/ou infectants,
30 associés à la sclérose en plaques, dans un échantillon
biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN
et/ou un ADN spécifique à chaque dit agent pathologique
et/ou infectant, et/ou leur ARN et/ou ADN complémentaire,
avec une association d'un premier fragment nucléotidique
35 et d'un second fragment nucléotidique, la séquence
nucléotidique dudit premier fragment comprenant une

séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, 5 notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs 10 séquences complémentaires, et la séquence nucléotidique dudit second fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence 15 nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

7/ Procédé de détection d'un premier agent 20 pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre un premier peptide codé de manière partielle ou totale par le premier fragment nucléotidique défini à la revendication 4, et/ou 25 un second peptide codé de manière partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique défini à la revendication 4.

8/ Composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le 30 premier peptide et/ou le second peptide, définis à la revendication 7.

9/ Composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un premier ligand spécifique du premier 35 peptide, et/ou un second ligand spécifique du second peptide.

10/ Fragment nucléotidique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, 5 SEQ ID N09, SEQ ID N010, SEQ ID N011 et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N01, 10 SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N009, SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

11/ ARN ou ADN et notamment vecteur de 15 réplication, comprenant un fragment selon la revendication 10.

12/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent 20 pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment selon la revendication 10, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de 25 préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.

13/ Amorce selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle possède une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, 30 SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires.

14/ Sonde susceptible de s'hybrider 35 spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent

pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment selon la revendication 10, notamment
5 une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.

15/ Sonde selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle possède une séquence nucléotidique choisie
10 parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026 et SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N010, et
15 SEQ ID N011, et leurs séquences complémentaires.

16/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 14 ou 15, ou d'une amorce selon la revendication 12 ou 13, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un premier agent
20 pathologique et/ou infectant, et/ou un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques.

17/ Agent pathogène et/ou infectant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une
25 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une
30 séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires.

18/ Composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, notamment pour le traitement de la sclérose
35 en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au

moins une partie d'un fragment selon la revendication 10, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.

5 19/ Procédé pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, l'agent pathogène et/ou infectant selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit agent, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au
10 moins un fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins
15 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires.

 20/ Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que, avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou
20 leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013 SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019,
25 SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec
30 une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013 SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et leurs séquences complémentaires, et on
35 amplifie ledit ARN et/ou ADN.

21/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un agent infectant et/ou pathogène associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique

5 audit agent et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à au moins une sonde comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023,

10 SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026 et SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N010, et SEQ ID N011 et leurs séquences complémentaires, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et

15 préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique consistant en une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022,

20 SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025 et SEQ ID N026, et SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N010, et SEQ ID N011, et leurs séquences complémentaires, et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

1/18

FIG 1

pol SHIH TGGAAAGTGT TGGACAGGG CGCTGAGGC TATGGGGTGC AGTGGGGGA 50
pol SHIH TGGGGCTAT AGCTCTACA TGGATGACAT OCTGCTGGGC TCC 93

SEQ ID NO 10

2/18

FIG 2

Consensus GTTTAGGGAT ANCCCTCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGOC CAAGATCTAG 50
 Consensus GCCACTTCTC AGGTCCAGSN ACTCTGTGCC TTCAG 85

SEQ ID NO3

Consensus GTTCAGGGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATCTTGA 50
 Consensus GCCAGTCTC ATACTGGAC ATCTGTGTC TTGGT 86

SEQ ID NO4

Consensus GTTCARRGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCW RGVATAGCC CAAGACTTGA 50
 Consensus GYCAATCTC ATACTGGAC ACTCTGTGC TTYRG 85

SEQ ID NO5

Consensus GTTCAGGGAT AGCTCCCATC TATTTGGCCT GGCATTACC CGAGACTTGA 50
 Consensus GCCAGTCTCY ATAGTGGAC ACTCTGTGC TTGG 85

SEQ ID NO6

Consensus GTGTGGCCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCTMTTG GYWRGYAT
 Consensus RRCYCRKAY YIRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYCTB KYOCTTYRGT
 Consensus ACATGGATGA C

SEQ ID NO7

FIG 4 4/18

CONSENSUS A

GTTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC 60
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q

AGGTCCAGGCACTCT GTTCCTTCAG 85
 R S R H S V P S
 G P G T L F L Q
 V Q A L C S F

CONSENSUS B

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCCTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H

ATACCTGGCACTCT TGTCTTCGGT 86
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L R
 T W T L L S F G

CONSENSUS C

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H

ATACCTGGCACTCT TGTCTTCAG 85
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L Q
 T W . T L L S F

CONSENSUS D

GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTTGGCCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H

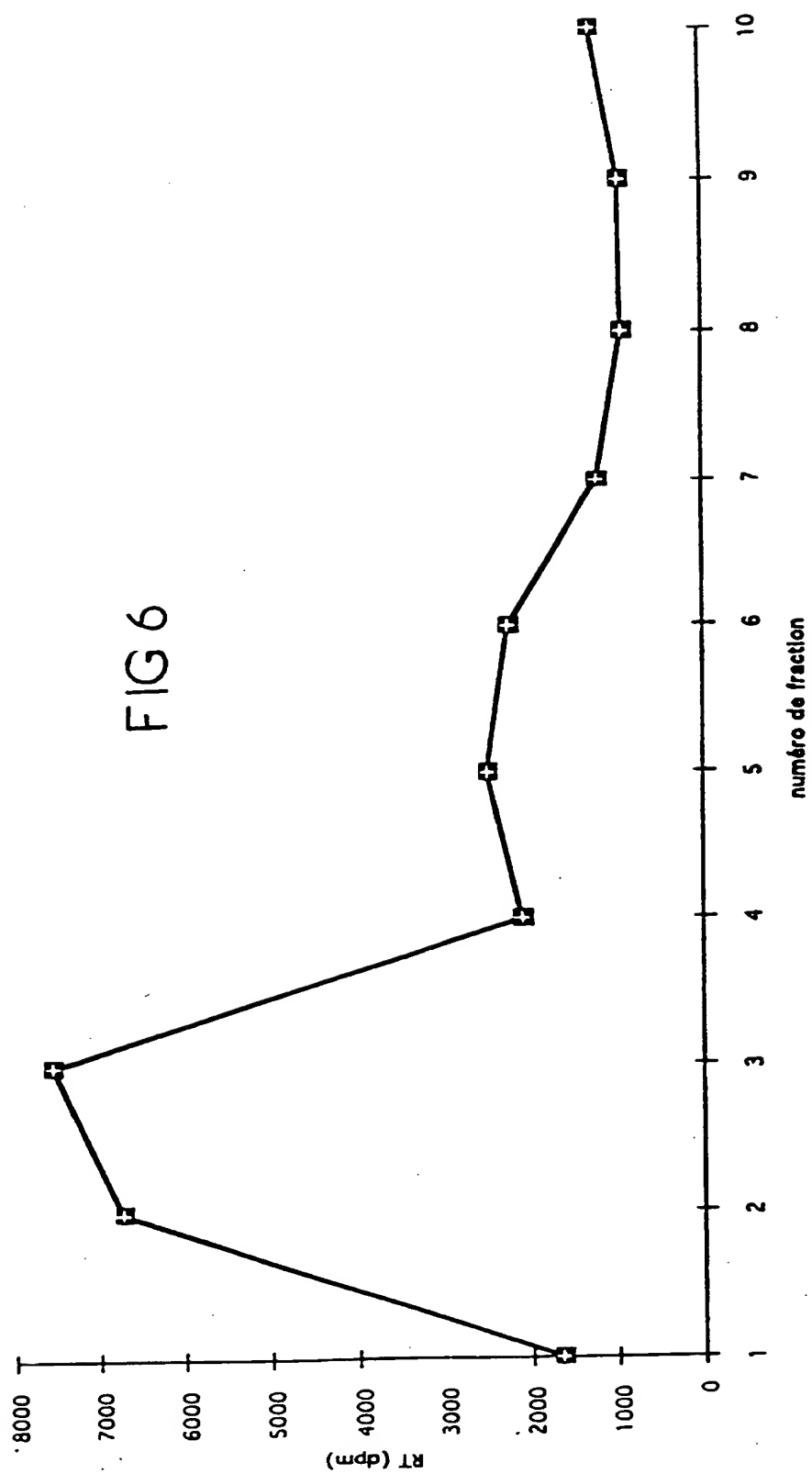
ATACGTGGCACTCT TGTCTTTGG 85
 I R G H S C P L
 Y V D T L V L W
 T W T L L S F

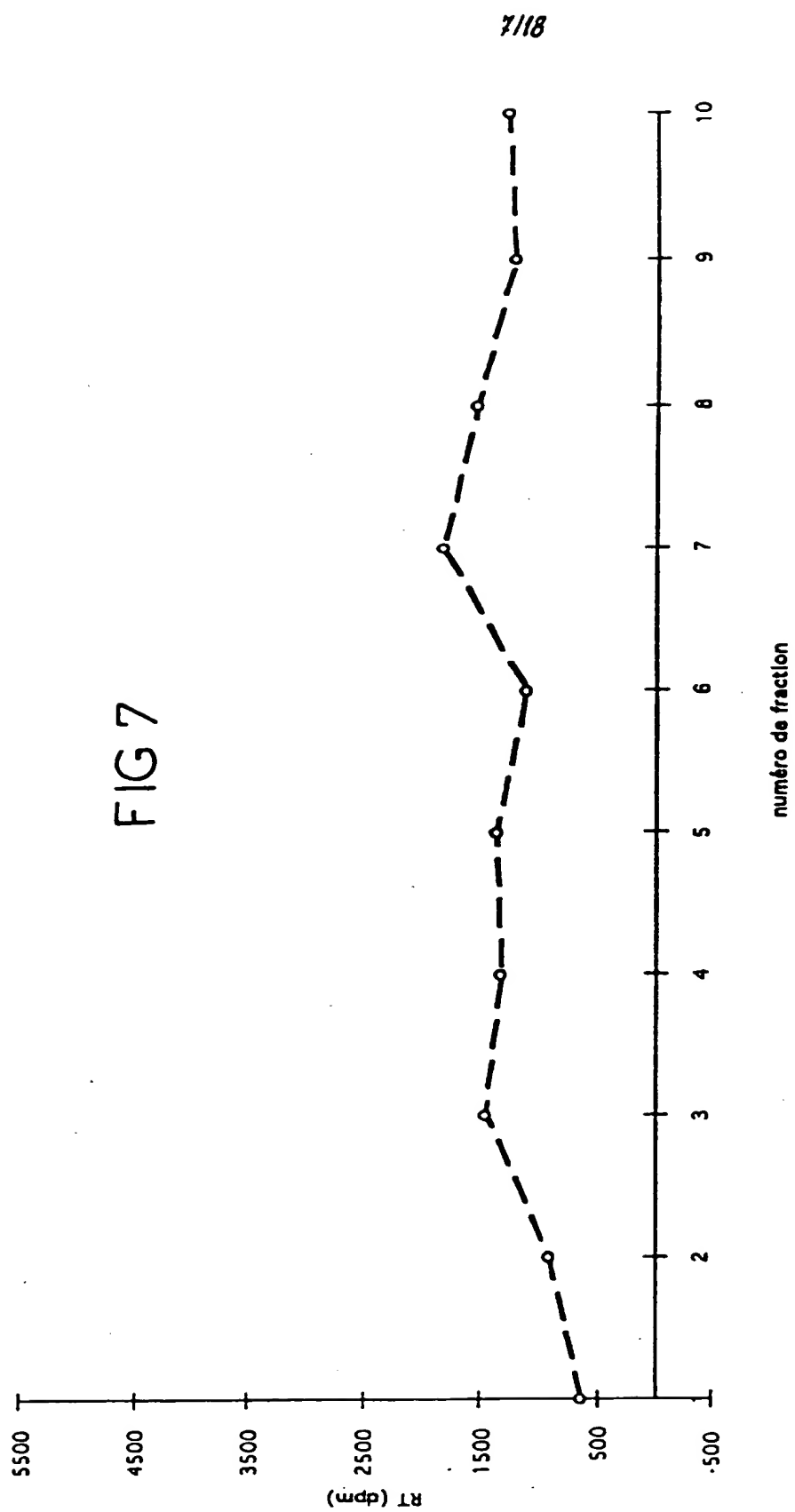
FIG 5 ^{5/18}

Consensus TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GCGTATCGCG TGCAGTTGOC 50
Consensus GGATGCGGCG TATAGCCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAG 96

SEQ ID NO 11

6/18





8/18
FIG 8

CAAGCCACCC AAGAACTCTT AAATTTCCTC ACTACCTIGTG GCTACAAGGT	50
TTCGAACCA AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT	100
TAAATTATC CAAGGCCAC AGGGGCTCA GTGAGGAAG TATCCAGCT	150
ATACTGGGTT ATCTCATOC CAAAACCTA AAGCACTAA GAGGGTTOCT	200
TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCCAGGT ACAACAAAA	250
TAGCCAGAC ATTATATCA CTAATTAAG AACTCAGAA AGCAATACC	300
TATTTAGTAA GATGGACAC TAAACAGAAG GCTTTCAGG CCTTAAGAA	350
GGCCCTAAC CAAGCCACG TGTTCAGCTT GCCACAGGG CAGATTTTT	400
CTTATATGG CACAGAAAA ACAGGAATG CTCTAGGAGT OCTTACACG	450
GTCCGAGGA TGAGCTTGA ACCCGTGGCA TACCTGAATA AGGAAATGA	500
TGTAGTGGCA AAGGGTGGC CTCATNGTTT ATGGGTAAAG GNGGCAGTAG	550
CAGTCNAGT ATCTGAAGCA GTTAAATTA TACAGGGAAG AGATCTTCT	600
GTTGGACAT CTCATGATGT GAACGGCATA CTCCTGCTA AAGGAGCTT	650
GTTGTGTCA GACAACATT TACTTAANTA TCAGGCTCTA TTTCTGAAG	700
AGCCAGTCT GNGACTGGC ACTTGIGCAA CTCCTAAC C	741

SEQ ID NO9

FIG 9 9/18

TCAGGGATAGCCCCCATCTATTTGGGCAGGCATTAGCCCAAGACTTGAGTC
AATTCTCATACCTGGACACTCTTGTCCTTCAGTACATGGATGATTTACTTT
TAGTCGCCCGTT CAGAAACCTTGTGOCATCAAGCCACCCAAGAACTCTTAA
CTTTCCTCACTACCTGTGGCTACAAGGTTTCCAAACCAAAGGCTCGGCTCT
GCTCACAGGAGATTAGATACTNAGGGCTAAAATTATCCAAAGGCCACCAGG
GOCCTCAGTGAGGAACGTATCCAGOCATACTGGCTTATCCTCATCCCAA
ACCTAAAGCAACTAAGAGGGTTCTTGGCATAACAGGTTTCTGCGAAA
ACAGATTCCCAGGTACASCOCAATAGCCAGACCATTATATACACTAATTA
NGGAAACTCAGAAAGCCAATACCTATTTAGTAAGATGGACACCTACAGAA
GTGGCTTTCAGGGOCCTAAAGAAGGOCCTAACCCAAGCCCCAGTGTT CAGC
TTGCCAACAGGGCAAGATTTTCTTTATATGCCACAGAAAAAACAGGAAT
AGCTCTAGGAGTCCTTACGCAGGTCTCAGGGATGAGCTTGCAACCCGTGGT
ATACCTGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

SEQ ID NO 8

10/18

FIG 10

SEQ ID NO 2

10 20 30 40 50 60 70
 CCC TTT GCC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GTA AGG AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG
 P F A T T S I L G V R K P N G Q W R L V Q E L R>
 TRANSLATION OF F11-1 (A)

80 90 100 110 120 130 140
 ATT ATC AAT GAG CCT GTT GTT CCT CTA TAC CCA CCT GTA CCT AAC CCT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA
 I I N E A V V P L Y P A V P N P Y T V L S Q I P>
 TRANSLATION OF F11-1 (A)

150 160 170 180 190 200 210
 GAG GAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GCC TTT TTC TGC ATC CCT GTA CCT GAC TCT
 E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S>
 TRANSLATION OF F11-1 (A)

220 230 240 250 260 270 280
 CAA TTC TTG TTT GCC TTT GAA GAT CCT TTG AAC CCA ACG TCT CAA CTC ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA GGG
 Q F L F A F E D P L N P T S Q L T W T V L P Q G>
 TRANSLATION OF F11-1 (A)

290

TTC AAG GGA
 F K G>

11/18

10 20 30 40 50 60 70
 CCG TTT GGC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GGA AGG AAA CCG AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTC CAA GAA CTC AGG
 P F A T T S I L G V R K P H G Q U R L V Q E L D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

80 90 100 110 120 130 140
 ATT ATC AAT GAG GCT GGT GGT CTA TAC CCA GCT GGA CTT AAC CTT TAT ACA GAG CTT TCC CAA ATA CCA
 I H E A V V F L Y P A V P H P Y T V L S Q I P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

150 160 170 180 190 200 210
 GAG CAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GGC TTT TTC TAC ATC CTT GGA CTT GAT GAT
 E K A E W F T V L D L K D A F F C I F V R P D S
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

220 230 240 250 260 270 280
 CAA TTC TGG TTT GGC TTT GGA GAT CTT TGG AAC CCA AGG TCT CAA CTC ACC TGG ACT ATT TTA CCG CAA CCG
 Q F L F A F E D F L H P T S Q L T W T V L P Q G
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

290 300 310 320 330 340 350
 TTC AGG GAT AGC CCG CTT CTA TTT GGC CAG CCA TTA CCG CAA GAC TGG AGT CAA TTC TCA TAC CAG GAC ACT
 F R D S F H L F G A L A Q D L S Q F S Y L D S
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

370 380 390 400 410 420 430
 CTT GGC CTT CAG TAC AGG GAT GAT TTA CTT TTA GTC GGC CTT TTA GGA ACC TGG TAC CTT CAA GTC ACC CAA
 L V L Q Y H D D L L L V A H S E T L C H Q A T G
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

440 450 460 470 480 490 500
 GAA CTC TTA ACT TTC CTC ACT ACC TAT GGC TAC AAG GAT TCC AAA CCA AAG CTT GGG CAC TAC TCA CAG GAG
 E L L T F L T T C G Y K V S E P K A R L C S Q D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

510 520 530 540 550 560 570
 ATT AGA TAC TTA GGG CTA AAA TTA TCC AAA GGC ACC AGG GGC CTC AGT GGG GAA GAT ACC CAG CTT AGA CAG
 I R Y X G L E L S E G T R A L S E E R I Q F I D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

580 590 600 610 620 630 640
 GCT TAT CTT CTT GGC AAA ACC CTA AAG CAA CCA AGA GGG TAC CTT GGC AGA ACA GAT TTC TAC CCA AAA CAG
 A T P H P K T L K Q L H G F L G I T G F C E K G
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

650 660 670 680 690 700 710 720
 ATT GCT AGG TAC AAC CCA AGA GGC AGA CCA TTA TAT ACA CCA ATT AGG GAA ACT CAG AAA GGC ATT ACC TAT
 I P R Y X P I A R F L Y T L I X E T Q K A N T D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

730 740 750 760 770 780 790
 TTA GGA AGA GGG ACA CTT ACA GGA GGG CTT CAG GGC CCA AAG AAG GGC CCA ACC CAA GGC CCA GGG TAC
 L V R W T P T E V A F Q A L K E A L T G A P V P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

800 810 820 830 840 850 860
 AGC TGG CCA ACA GGG CAA GAT TTT TCT TTA TAT GGC ACA GGA AAA ACA GGA AGA CTT CCA GGA GGC CTT AGG
 S L P T G Q D F S L Y A T E K T G I A L G V L D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

870 880 890 900 910 920 930
 CAG GTC TCA GGG ATG AGC TTG CAA CCG GTC GGA TAC CAG AGT AAG GAA ATT GAT GGA GTG GCA AAG GAT TGG
 Q V S G H S L Q P V V Y L S E E I D V V A K G W
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

940 950 960 970 980 990 1000
 CTT CTT AGT TTA TGG GGA ATG GGG CCA GGA GCA GTC TTA GGA TCT GAA GCA GTT AAA AGA AGA CAG GGA AGA
 P H X L W V H X A V A V S E A V K I I Q G D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAT CTT AGT GGG TGG ACA TCT CTT GAT GTC AGC GGC AGA CTC ACT GCT AAA GGA GAC TTG TGG TTG TCA GAC
 D L X V W T S H D V N G I L T A K G D L W L S D
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150
 AAC CAT TTA CTT AAT TAT CAG CTT CTA TTA CTT GAA GAG CCA GTG CTG AGA CTG CCG ACT TGT GCA ACT CTT
 N H L L X Y Q A L L L E E P V L K L R T C A T L
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL (A)

AAA CCG
 K P

FIG 11 SEQ ID NO 1

10 20 30 40
* * * *
TGCAAGCTTCACCGC TTGCTGGATGTAGGC CTCAGTACCGGNGTG
50 60 70 80 90
* * * * *
CCCCGCGCGCTGTAG TTGATGTAGAAAGC GCGCGGAAACACGCG
100 110 120 130
* * * *
GGACCAATGCGTGGC CAGCTTGCGGCGCCAG CGCCTCGTTGCCATT
140 150 160 170 180
* * * * *
GGCAGCGCCACGCC GATATCAACCGGCAT GGCGCGCGAGAGCGC
190 200 210 220
* * * *
CAGCAGACCGGGGCG CAGCGGCGCATTCTC AACGCGGGCTGTC
230 240 250 260 270
* * * * *
GAACCATTCGGGGCG GATTTCGCAAGACC GCGATGCTGGTTGGA
280 290 300 310
* * * *
GAGCCAGGCCCTGGC CAGCAACTGGCACAG GTTCAGGTAAACCTG
320 330 340 350 360
* * * * *
CTTGTCGCGCAACCA CAGCAGCAGGGGGT CGCCTTGTCGGCTC
370 380 390 400
* * * *
GTGCTGATTGGTGAT CCACAGTCCAGCCCC GACGATGGGCTTCAC
410 420 430 440 450
* * * * *
GCGCTTGCCACGGCG TTCTTGTAGANGCG CACGAGCCCGAAGGC
460 470 480 490
* * * *
ATTGGCGAGATGGT CAGCGCCAGGGGCG CATGCCATCTTTGGC
500 510 520 530 540
* * * * *
GGCAGCCTTGACGGC ATCGTCGAGACGGAC ATTGCCATGACGAC
550 560 570 580
* * * *
GGAATATTCCGAGTG GAGACGGAGGTGGAC GAAGCGCGCGGAATT
590 600 610 620 630
* * * * *
CATCGCGTATTGTA ACGGGTGACACCTTC CGCAAAGCATTCGGG
640 650 660 670
* * * *
ACGTGCCCCGATTGAC CCGGAGCAACCCCGC ACGGCTGCGCGGGCA
680 690 700 710 720
* * * * *
GTTATAATTTGGCT TACGAATCAACGGGT TACCCCGGGCGCTG
730 740
* *
AAGCCTATCGCGTGC AGTTGCCGGATGC

FIG 12

SEQ ID NO 12

	10	20	30	40	50	60	70	80	90																							
TGC	AAG	CTT	CAC	GCC	TTG	CTG	GAT	GTA	GTC	TTC	GAT	GTA	GAA	AGC	GCC	CGG	AAA	CAC	GCG	GGA	CCA											
C	K	L	H	R	L	L	D	V	G	L	S	T	G	V	P	P	R	A	L	*	F	D	V	E	S	A	R	K	H	A	G	P
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [A]																																
A	S	F	T	A	C	W	M	*	A	S	V	P	X	C	P	A	R	C	S	S	M	*	K	A	P	G	N	T	R	D	Q	
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [B]																																
Q	A	S	P	L	A	G	C	R	P	Q	Y	R	X	A	P	R	A	V	V	R	C	R	K	R	P	E	T	R	G	T		
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [C]																																
<	C	A	E	G	S	A	P	H	L	G	*	Y	R	X	A	G	R	A	T	T	R	H	L	F	R	G	S	V	R	P	V	L
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [D]																																
<	A	L	K	V	A	Q	I	Y	A	E	T	G	X	H	G	A	R	Q	L	E	I	Y	F	A	G	P	F	V	R	S	W	
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [E]																																
<	L	S	*	R	K	S	S	T	P	R	L	V	P	T	G	R	A	S	Y	N	S	T	S	L	A	R	F	C	A	P	G	
TRANSLATION OF MSRV-2ELL [F]																																

[illegible][illegible]

F1G13

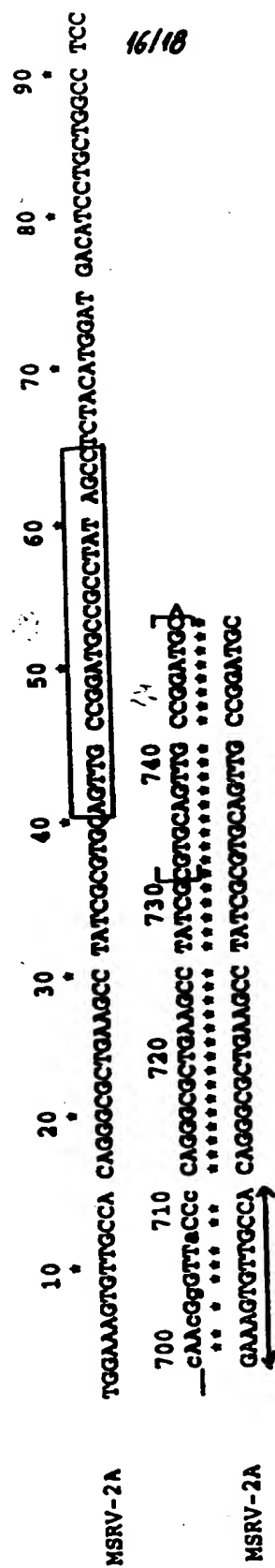
[illegible]

FIG 13

[illegible]

680	690	700	710	720	730	740
GCA GTT ATA ATT TCG GCT TAC GAA TCA AGG GGT TAC CCC AGG CCG CTG AAG CCT ATC GCG TGC AGT TGC CCG ATG C	A V I I S A Y E S T G Y P R A L K P I A C S C R M X					
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (A)						
Q L * F R L T N Q R V T P G R * S L S R A V A G C						
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (B)						
G S Y N F G L R I N G L P Q G A E A Y R V Q L P D A						
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (C)						
<L * L K P K R I L P N G W P A S A * R T C N G S A						
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (D)						
<C N Y N R S V F * R T V G P R Q L R D R A T A P H						
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (E)						
<A T I I E A * S D V P * G L A S F G I A H L Q R I						
TRANSLATION OF MSRV-2ELL (F)						

FIG 14



17/18

FIG 15

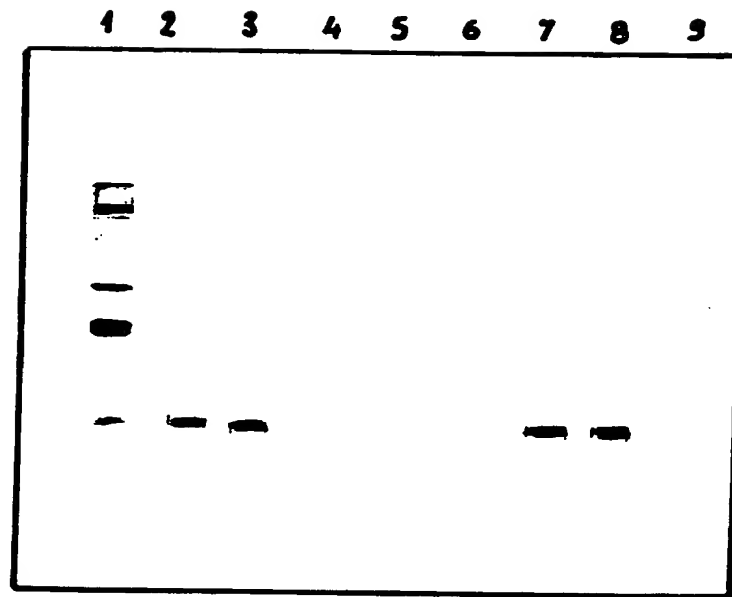


FIG 16 18/18

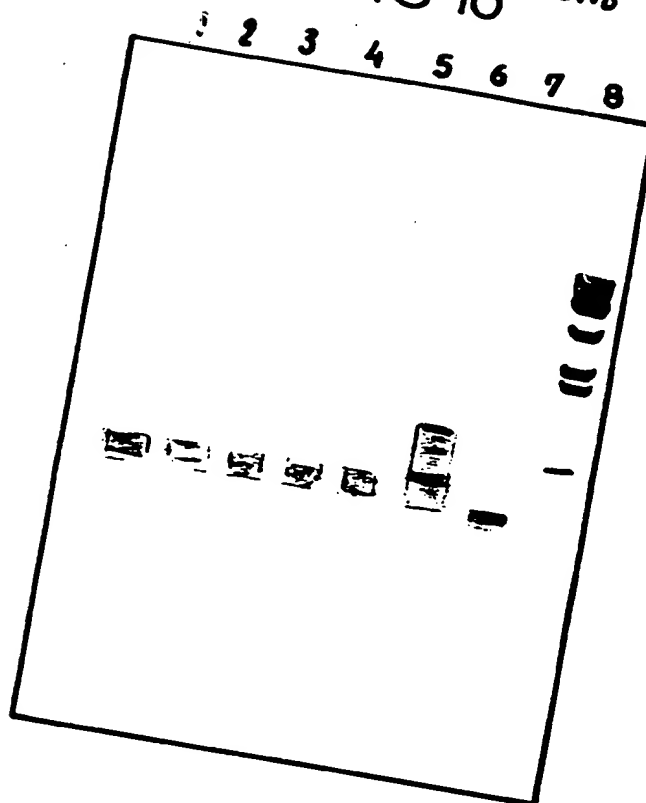


FIG 17

